PHYTOPATHOLOGISCH LABORATORIUM

„WILLIE COMMELIN SCHOLTEN"

BAARN

MEDEDELING No. 32

EEN VIRUS IN ATROPA BELLADONNA

With a summary:

A virus in Atropa belladonna

DOOR

L. C. P. KERLING EN D. H. BRANTS

From original

OVERDRUK UIT:
TIJDSCHRIFT OVER PLANTENZIEKTEN 66: 288-294 (1960)

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
21 FEB 1961

EEN VIRUS IN *ATROPA BELLADONNA*

T. Pl.ziekten 66 (1960): 288–294

EEN VIRUS IN *ATROPA BELLADONNA*[1]

With a summary: A virus in Atropa belladonna

DOOR

L. C. P. KERLING en D. H. BRANTS[2]

Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten", Baarn

INLEIDING

Op een terrein te Baarn, dat geregeld in gebruik is voor het kweken van groenten en sierplanten, werd *Atropa belladonna* L. uitgeplant. Elk voorjaar en iedere zomer vertonen de bladeren dezer planten een mozaïekachtige verkleuring, waarbij het bladoppervlak enigszins bobbelig wordt en een lichte bladmisvorming kan optreden. De bladrand kan onregelmatig ingesnoerd zijn. Oudere bladeren en stengels vertonen soms chlorotische vlekken met necrotische centra. De symptomen komen overeen met die beschreven door SMITH (1946, 1957), veroorzaakt door „*Belladonna* mosaic virus".

Om na te gaan of het virus, dat de symptomen bij *Atropa* in Engeland veroorzaakt, identiek is met het agens dat in Baarn bij deze plant de ziekte veroorzaakt, werden inoculaties uitgevoerd met perssap van zieke *Atropa*-planten. Het sap werd na filtreren door kaasdoek verdund met water, met een natriumsulfiet- of met een fosfaatoplossing.

Bladeren van toetsplanten behorend tot de Solanaceae werden hiermee ingewreven, evenals enkele niet tot deze familie behorende planten. De geïnoculeerde planten waren opgekweekt in de kas bij een temperatuur van 18° tot 23 °C. Ook werden stengels van zieke *Atropa*-planten geënt op onderstammen van planten, behorend tot de Solanaceae.

DE SYMPTOMEN OP HET TOETSSORTIMENT

De inoculaties met perssap, waaraan een buffer was toegevoegd, slaagden beter dan die met ongebufferd perssap. Op de volgende planten waren soms na drie, maar altijd na zes dagen, duidelijke ziektesymptomen waarneembaar op de geïnoculeerde bladeren, terwijl later de ziekte systemisch werd.

Atropa belladonna L. De boven beschreven symptomen ontwikkelden zich ook op planten opgekweekt in de kas. De chlorotische vlekjes, die na vijf dagen zichtbaar werden, kregen later een necrotisch centrum (fig. 1).

Capsicum annuum L. Necrotische vlekken en strepen op de bladeren ontstonden reeds drie tot vijf dagen na de inoculatie. Zij breidden zich uit langs de nerven tot op de stengel, waarna de aangetaste bladeren afvielen. Ook de jonge bladeren vertoonden later necrotische vlekjes. De planten bleven achter in ontwikkeling vergeleken met de controle-planten.

Hyoscyamus niger L. Ook hier ontstonden op de oudere bladeren chloroti-

[1] Aangenomen voor publikatie 9 sept. 1960.

[2] Met medewerking van Mevr. J. M. DEKHUYZEN-MAASLAND, Dr. S. GAYED (Karthoum), Mej. C. VAN HEUVEN, C. DE VOOYS en Mej. R. VAN WESSEM.

sche vlekken met een necrotisch centrum, maar de jonge bladeren vertoonden een duidelijk mozaïek, gepaard gaande met een licht worden van de nerven. De chlorosen overheersten hier de necrosen.

Nicandra physaloides GAERTN. De geïnoculeerde bladeren vormden anthocyaan, waarna zij necrotisch werden en afvielen. De jonge bladeren vertoonden na acht dagen chlorosen en necrosen en waren sterk misvormd. Ook de stengel werd necrotisch. De planten bleven sterk in groei achter vergeleken met de controle-planten.

Nicotiana glutinosa L. Op de oudere bladeren ontstonden massieve of ringvormige, necrotische vlekken, die zich langs de nerven uitbreidden tot zelfs in de niet geïnoculeerde bladeren. De planten stierven snel af.

Nicotiana tabacum L. var. Samsun en White Burley. Ook hier traden na inoculatie 1 tot 15 mm grote, lokale lesies op in de vorm van bogen, halvemaanvormige figuren of ringen, terwijl de necrosen zich vaak langs de nerven voortzetten. Er ontstonden dan eikebladachtige tekeningen op de bladeren. Ook de nerven zelf konden necrotisch worden. Bij toedienen van virus in hoge concentratie ontstonden voornamelijk scherp afgegrensde vlekken in zo grote getale, dat zij elkaar raakten. Ook op de zich later ontwikkelende bladeren ontstonden dan necrosen. De planten stierven soms af. Bij toedienen van een lagere virusconcentratie nam het aantal lokale lesies af, maar de necrosen verspreidden zich nu langs de nerven tot in de stengel (fig. 2).

Petunia hybrida. Er ontstonden necrotische strepen en kringen op bladeren en stengel. De bladeren waren vervormd.

Physalis floridana RYDB. Reeds twee dagen na de inoculatie traden chlorosen en necrosen op bij de behandelde bladeren, die daarna afvielen. Na negen tot tien dagen werd de ziekte systemisch. Er was een sterke anthocyaanvorming en ook ontstonden er necrosen. De zieke planten bleven kleiner dan de gezonde.

Nicotiana tabacum var. Samsun bleek een goede toetsplant, daar na inwrijven met verdund, infectieus perssap de lokale lesies afzonderlijk geteld konden worden.

De volgende planten bleken 14 dagen na de inoculatie met perssap van zieke *Atropa*-planten veel virus te bevatten: *Hyoscyamus niger*, *Nicandra physaloides*, *Petunia hybrida* en *Physalis floridana*. Ook in de wortels en in het vruchtvlees van zieke *Atropa*-planten was een zeer hoge virusconcentratie aanwezig. Een hoog virusgehalte werd ook gevonden in *Datura stramonium* L., die na inoculatie slechts onduidelijke symptomen vertoonde. Het virusgehalte was eveneens hoog in *Solanum nigrum* L., waarvan de bladeren geen andere symptomen te zien gaven dan een onregelmatige vorming van anthocyaan. De geïnfecteerde planten van *Capsicum annuum*, die hevige symptomen vertoonden, bleken daarentegen slechts weinig virus te bevatten.

De volgende planten vertoonden na inoculatie geen symptomen: *Solanum lycopersicum* L., *Gomphrena globosa* L., *Cucumis sativus* L., *Chenopodium album* L., *Spinacia oleracea* L., *Zea mays* L. en *Phaseolus vulgaris* L. var. Beka. Waarschijnlijk bevatten zij ook geen virus, daar met het perssap op tabak geen symptomen konden worden teweeggebracht.

Met sap van zieke *Petunia*- en tabaksplanten werden gezonde *Atropa*-planten geïnoculeerd, die na vijf tot zes dagen de oorspronkelijke symptomen vertoonden. Dit gebeurde ook, als het virus achtereenvolgens door verschillende waardplanten gevoerd werd, b.v. van *Atropa* via *Physalis* en *Petunia* of tabak weer naar

Atropa terug.

Ook door enten kon het virus overgebracht worden: een geïnfecteerde stengeltop van *Atropa*, geënt op een gezonde *Atropa*-onderstam of op een *Physalis*-onderstam, deed deze ziek worden.

De bepaling van het verdunningseindpunt en de inactiveringstemperatuur

Sap van op natuurlijke wijze geïnfecteerde *Atropa*-planten werd met water verdund en uitgewreven op *Nicotiana glutinosa* en op *Capsicum annuum*. Een verdunning van 1 : 10 gaf nog symptomen op deze waardplanten, een verdunning van 1 : 100 nog op *Nicotiana tabacum* var. White Burley. Sap uit 16 dagen van te voren geïnoculeerde *Hyoscyamus*-planten gaf nog op alle toetsplanten, inclusief *Hyoscyamus* zelf, symptomen bij een verdunning van 1 : 1000. Een verdunning van 1 : 10.000 deed zelfs nog symptomen op Samsun-tabak ontstaan. Het verdunningseindpunt van het virus zal, althans bij *Hyoscyamus*, tussen 10^{-3} en 10^{-4} liggen.

De inactiveringstemperatuur ligt tussen 70° en 80°C. Toen gebleken was dat het virus het karakter had van een bodemvirus, werd de inactiveringstemperatuur van besmette grond bepaald. Na verhitting van grondmonsters binnen een bepaald temperatuurtraject, resp. bij 50 tot 60°, 60 tot 70° en 70 tot 80°C, bleek in het laatste geval het virus in de grond geïnactiveerd te zijn.

Vorm en afmeting van de virusdeeltjes

Elektronenfoto's[1] werden gemaakt van bloedingssap van zieke *Nicandra*-planten. De virusdeeltjes zijn staafvormig en van ongelijke lengte, vaak geknikt. Het beeld vertoont grote overeenkomst met dat van ratelvirus (VAN DER WANT & ROZENDAAL, 1948).

Het transport van het virus in de plant

Als bladeren van tabaksplanten, var. Samsun, gegroeid in „gezonde" tuingrond, werden ingewreven met perssap van zieke *Atropa*-planten, bleken ook de wortels na verloop van tijd virus te bevatten (tabel 1).

TABEL 1. Aantal dagen nodig voor het transport van *Atropa*-virus van de bladeren naar het wortelstelsel bij Samsun-tabak.
Number of days needed for transport of Atropa-*virus from the leaves to the root-system of Samsun-tobacco.*

Tijd na inoculatie in dagen / *Time in days after inoculation*	Aantal uitgewreven wortelstelsels / *Number of tested root systems*	Aantal toetsplanten met symptonen[2] / *Number of testplants with symptoms*[2]
8	5	1/5
10	4	1/4
13	4	0/4
15	4	3/4
17	4	2/4

[1] Hiervoor onze dank aan Prof. Dr. L. H. BRETSCHNEIDER, directeur van het „Centrum voor Submicroscopisch Onderzoek van Biologische Objecten" van de Rijksuniversiteit te Utrecht.

[2] Teller: aantal toetsplanten met symptomen. *Numerator: number of testplants with symptoms.* Noemer: totaal aantal toetsplanten. *Denominator: total number of testplants.*

In tabaksplanten had dus virustransport van de bladeren naar de wortels plaats.

Na dompelen van wortelstelsels van gezonde tabaksplanten in infectieus sap, bleken na uitplanten in gestoomde grond wel de wortels na verloop van tijd geïnfecteerd te zijn, maar niet de bovengrondse delen. In tabak scheen geen virustransport plaats te vinden van de wortels naar de bladeren. Waren *Atropa*-planten met de wortels in infectieus sap gedompeld, dan vertoonden de bladeren na verloop van tijd wel ziektesymptomen. Hier had blijkbaar wel virustransport in bovenwaartse richting plaatsgevonden.

Kunstmatig geïnfecteerde *Atropa*-planten werden opgekweekt in van te voren gestoomde grond. Deze zieke planten werden verwijderd en vervangen door gezonde tabaksplanten. Na twee maanden vertoonden de bladeren hiervan geen symptomen, maar het perssap uit de wortels bevatte virus. Door het opkweken van de zieke *Atropa*-planten was de gestoomde grond dus besmet geraakt, evenals de tabakswortels.

Infectie van planten in besmette grond

Het was duidelijk geworden, dat het wortelstelsel van gezonde tabaksplanten, die in besmette grond werden overgezet, vrij snel met virus besmet werd. Deze grond was afkomstig van een terrein, waarop reeds gedurende enkele jaren zieke *Atropa*-planten gekweekt waren.

Op verschillende manieren werd getracht een inzicht te verkrijgen in de wijze, waarop een infectie tot stand zou kunnen komen. Uit de geïnfecteerde wortels

Tabel 2. Aantal toetsplanten van *Nicotiana tabacum* met symptomen na inoculatie met perssap van wortels van planten, die een aantal dagen in besmette grond hadden gestaan.
Number of Nicotiana tabacum *testplants developing symptoms after inoculation with rootsap of plants, grown in infested soil for various periods.*

Tijd in dagen in besmette grond *Time in days in infected soil*	Planten met symptomen[3] *Plants with symptoms*[3]
0[1]	0/5
1	0/10
2	2/10
4	3/10
6	6/10
8	7/10
11	7/10
14	7/10
0[2]	0/5

[1] 5 controle-planten, waarvan perssap uit de wortels op toetsplanten werd uitgewreven vóór de proef.
5 control plants from which rootsap was tested on tobacco leaves at the beginning of the experiment.

[2] Idem na de proef.
The same after the experiment.

[3] Teller: aantal toetsplanten met symptomen.
Noemer: totale aantal toetsplanten.
Numerator: number of testplants with symptoms.
Denominator: total number of testplants.

werden talrijke micro-organismen geïsoleerd en in reincultuur gebracht. Suspensies hiervan werden op tabaksbladeren uitgewreven, echter zonder enig gevolg. Ook schimmels, geïsoleerd uit wortels van jonge, aanvankelijk steriel opgekweekte tabaksplantjes die in besmette grond waren overgezet, werden op aanwezigheid van virus getoetst, doch zonder resultaat.

Nagegaan werd vervolgens, hoeveel tijd na het overplanten van gezonde planten in besmette grond het virus in de wortels aangetoond kon worden. Tabaksplanten werden in het vijfbladig stadium in besmette grond overgezet, waarin zij één of meer dagen bleven, alvorens het wortelstelsel werd uitgeperst. Met het perssap werden gezonde tabaksplanten geïnoculeerd. Voor en na de proef werden de wortels van de controle-planten eveneens op virus getoetst (tabel 2). Ook werd nagegaan of de nog aan de wortels van de planten uit de besmette grond hangende aardedeeltjes een infectie op de toetsplanten teweeg konden brengen. Dit bleek niet het geval te zijn.

Twee dagen na het overplanten in besmette grond bleken in enkele gevallen gezonde wortels al geïnfecteerd te zijn. Het was de vraag, hoe dit geschiedde: zou het virus binnen kunnen komen door schuren langs gronddeeltjes, waaraan het virus gebonden was of zouden vectoren aanwezig zijn? In het eerste geval zou men kunnen denken, dat het de jonge worteltopjes moesten zijn, die na het overplanten uitgroeien en contact maken met de bodemdeeltjes. Daarom werd nu de volgende proef uitgevoerd. Gezonde planten werden uitgeplant in virus-zieke grond. Twee tot drie dagen later werden er planten uit de grond genomen. Van telkens acht planten werd het wortelstelsel goed schoongespoeld en uitgeperst, waarbij een scheiding gemaakt werd tussen de oude wortels, die reeds vóór het uitplanten aanwezig waren en de jonge, in de zieke grond gevormde toppen. Na inoculeren met de oude wortelstelsels bleek 50% van de toetsplanten symptomen te vertonen als de wortels twee dagen en 75% als de wortels drie dagen in besmette grond hadden gestaan. De toetsplanten, geïnoculeerd met perssap van jonge worteltoppen die zich in twee dagen in besmette grond ontwikkeld hadden, vertoonden geen symptomen. Wel was dit het geval met sap uit jonge worteltopjes, die zich na een verblijf van drie dagen in besmette grond ontwikkeld hadden.

Deze proef werd nog eens herhaald, waarbij van telkens 10 tabaksplanten, aanvankelijk opgekweekt in steriele grond, de wortelstelsels werden uitgeperst nadat de planten gedurende nul, een, twee of meer dagen in besmette grond gestaan hadden. Het perssap werd op telkens 10 gezonde tabaksplanten uitgewreven. Ook nu bleek, dat wortels van planten reeds twee dagen na het overzetten in besmette grond geïnfecteerd konden zijn.

De mogelijkheid, dat nematoden als vector optreden, werd onderzocht op het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek te Wageningen, onder leiding van Dr. J. W. Seinhorst (Sol, van Heuven & Seinhorst, 1960).

Bespreking van de resultaten; vergelijking met ratelvirus

Het in Nederland gevonden virus uit *Atropa belladonna* is naar alle waarschijnlijkheid identiek met het door Smith (1946, 1957) beschreven „*Belladonna* mosaic virus". De symptomen op verschillende waardplanten komen volgens de beschrijvingen goed overeen. Wel bleken nog andere Solanaceae dan die door Smith genoemd, waardplanten voor het virus te kunnen zijn en wel: *Nicandra*

physaloides, *Physalis floridana*, *Petunia hybrida* en *Capsicum annuum*. Het verdunningseindpunt en de inactiveringstemperatuur bleken overeen te komen.

Elektronenfoto's van het *Atropa*-virus gaven grote overeenkomst te zien met foto's van een stam van ratelvirus, ontvangen uit Wageningen.[1] Symptomen, veroorzaakt door het *Atropa-belladonna*-virus, werden vergeleken met die, welke door deze stam van het ratelvirus veroorzaakt werd.

Het bleek nu, dat ook het *Atropa*-virus via de grond op gezonde tabaksplanten kan overgaan. Reeds twee dagen nadat gezonde tabaksplanten in besmette grond overgezet waren, kon het virus in de wortels worden aangetoond.

Op Samsun-tabak en op *Atropa* waren de symptomen, veroorzaakt door dit virus, vrijwel identiek met die veroorzaakt door het ratelvirus. *Hyoscyamus niger* reageerde echter op het ratelvirus met vrij sterke necrosen, waarbij de planten tenslotte afstierven, terwijl het *Atropa*-virus op deze planten in hoofdzaak chlorotische verschijnselen en mozaïek veroorzaakte. Ook *Nicandra* en *Physalis* reageerden op het ratelvirus heviger dan op het *Atropa*-virus. Terwijl tabak in ratelzieke grond ook bovengronds hevige symptomen kan vertonen, gebeurde dit in *Atropa*-zieke grond niet. Toch lijkt het *Atropa*-virus sterk verwant met het ratelvirus, misschien moet het zelfs als een stam van dit virus beschouwd worden.

SUMMARY

In a garden at Baarn, The Netherlands, *Atropa belladonna* plants, grown from seed, showed symptoms similar to those described by SMITH (1946, 1957) for „*Belladonna* mosaic". After inoculation of solanaceous test plants with sap from diseased plants, the following species showed symptoms: *Atropa belladonna* L., *Capsicum annuum* L., *Hyoscyamus niger* L., *Nicandra physaloides* GAERTN., *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tabacum* L. var. Samsun, *Petunia hybrida* and *Physalis floridana* RYDB. The symptoms suggest that the virus may be identical with that described by SMITH. A high virus concentration was found in *Hyoscyamus niger*, *Nicandra physaloides*, *Petunia hybrida*, *Physalis floridana*, in the roots and the pericarp of diseased *Atropa* plants, and also in *Solanum nigrum* L. and *Datura stramonium* L. The latter two species showed hardly any symptoms. A low virus concentration was found in *Capsicum annuum*, though this plant showed severe symptoms.

The dilution end point of the virus was between 10^{-3} and 10^{-4}; virusinactivation occurred between 70° and 80 °C.

In electron micrographs the rod-shaped virus particles appeared similar to those of rattle virus.

Virus could be detected in the roots of tobacco plants after the leaves had been inoculated with sap of diseased *Atropa*-plants (Table 1). The reverse did not occur. Following immersion of the roots of tobacco plants in virus-containing sap these plants were potted in steamed soil. Subsequently the roots proved to be infected but the stems and leaves contained no virus. However, *Atropa* plants treated in the same way, did show leaf symptoms.

It appeared, that the roots of young, healthy tobacco plants could become infected with virus, when grown in naturally infested soil for only two days

[1] Hiervoor onze dank aan Mej. J. DIJKSTRA, Laboratorium voor Virologie van de Landbouwhogeschool te Wageningen.

(Table 2). Fungus cultures isolated from diseased roots did not show any infectivity. Nematodes are probably the vectors of this virus (SOL, VAN HEUVEL & SEINHORST, 1960).

LITERATUUR

SOL, H. H., J. C. VAN HEUVEN and J. W. SEINHORST, – 1960. On the transmission of rattle virus and Atropa belladonna virus by Nematodes. T.Pl.-ziekten 66: 228–231.

SMITH, K. M., – 1946. Virus diseases of farm and garden crops. Worcester: 1–111.

SMITH, K. M., – 1957. A textbook of plant virus diseases, 2nd ed., London.

WANT, J. P. H. VAN DER & A. ROZENDAAL, – 1948. Electronen-microscopisch onderzoek van het virus, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. T. Pl.-ziekten 54: 134–141.

DRUK: H. VEENMAN EN ZONEN N.V. – WAGENINGEN

Fig. 1. *Atropa belladonna*
a. gezond blad *healthy leaf*
b. blad geïnfecteerd met *Atropa-belladonna*-virus
leaf infected with Atropa belladonna *virus*

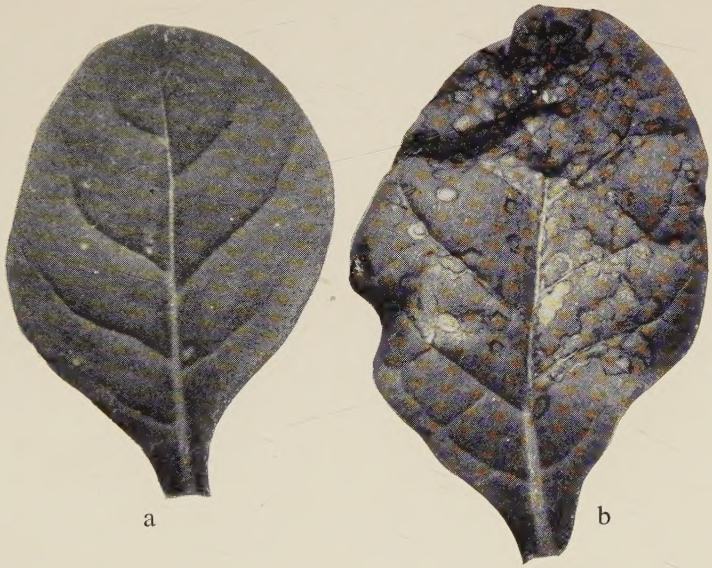

Fig. 2. *Nicotiana tabacum* White Burley
a. gezond blad *healthy leaf*
b. blad geïnfecteerd met *Atropa-belladonna*-virus
leaf infected with Atropa belladonna *virus*